



评述

中国知名大学及研究院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

DNA 甲基化在植物与双生病毒互作中的作用

杨秀玲, 丁波, 杨秋颖, 周雪平*

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: zzhou@zju.edu.cn; xpzhou@ippcaas.cn

收稿日期: 2016-01-08; 接受日期: 2016-02-17; 网络版发表日期: 2016-04-26

国家自然科学基金(批准号: 31390422, 31200117)资助

摘要 DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰, 在维持基因组稳定、调控基因表达、转座子沉默以及植物抗逆等过程中具有重要作用. 基因组为单链环状 DNA 的双生病毒复制过程中形成的双链 DNA 与组蛋白结合形成微染色体, 可诱导并成为 DNA 甲基化的靶标. 而相应地, 双生病毒在与植物长期斗争中, 进化出多种不同类型的抑制子并且通过不同的策略来抑制 DNA 甲基化以逃脱植物的防御反应. 本文将结合植物与病毒互作中的研究重点, 简述 DNA 甲基化在植物抗双生病毒方面的研究进展, 并围绕双生病毒编码的蛋白抑制 DNA 甲基化的机制进行综述, 以更好地理解植物中 DNA 甲基化介导的表观遗传调控在植物与双生病毒互作中的作用.

关键词 DNA 甲基化, 双生病毒, 植物-病毒互作

植物病毒病素有植物癌症之称, 由于缺乏有效的防治方法, 每年给全球农业生产带来严重损失. 基因组为单链环状 DNA 的双生病毒是最大的一类植物病毒, 已在全球 50 多个国家和地区的番茄(*Solanum lycopersicum*)、木薯(*Manihot esculenta*)和棉花(*Gossypium hirsutum*)等作物上造成严重危害^[1,2]. 由于基因组比较小(约 2.5~3.0 kb), 自身仅编码 6~7 个蛋白, 双生病毒需要依赖其编码的蛋白与寄主植物的相互作用才能完成复制、转录和系统移动等生活史. 双生病毒与寄主互作后, 调控了寄主的细胞周期、信号转导等多个生物学过程^[3~5]. 为了应对双生病毒侵染, 植物在与双生病毒长期斗争中进化出多层次的防御机制^[3,6,7].

RNA 沉默是目前公认的植物抵御病毒侵染的重要机制^[8,9]. 根据作用部位和作用机制的不同, RNA 沉默可以划分为小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)介导的转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)和转录水平基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS). PTGS 已被广泛地证实是植物抵御病毒侵染的一种重要机制. 为了抗衡这种机制, 几乎所有的植物病毒都编码了 PTGS 抑制子来逃脱植物对病毒的防御反应^[6,10~12]. 近年来, 随着研究的深入, DNA 甲基化介导的 TGS 被认为是植物抵御双生病毒侵染的另一重要手段. 与抵御植物 PTGS 介导的防御反应相似, 双生病毒与植物长期共进化过程中编码了能够抑制 DNA 甲基化的

引用格式: 杨秀玲, 丁波, 杨秋颖, 等. DNA 甲基化在植物与双生病毒互作中的作用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 514–523
Yang X L, Ding B, Yang Q Y, et al. Molecular mechanism of DNA methylation in plant-geminivirus interaction. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 514–523, doi: 10.1360/N052016-00038

蛋白^[1,3,6,7,13]. 本文将对 DNA 甲基化在植物与双生病毒互作中的作用作一综述, 以便更好地了解植物防御与双生病毒的反防御机制.

1 DNA 甲基化

1.1 DNA 甲基化的模式

DNA 甲基化是指在甲基转移酶的作用下将 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine, SAM)的甲基基团转移至胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶. DNA 甲基化包括从头甲基化和维持甲基化两种模式. 从头甲基化是指在从未发生甲基化的位点上发生甲基化修饰, 而维持甲基化是指维持甲基化的酶可识别新合成的半甲基化双链 DNA, 并将甲基添加到新链的非甲基化胞嘧啶上. 动物中大部分的胞嘧啶甲基化发生在对称性的 CG 位点, 而在植物中, DNA 甲基化既包括对称性的 CG, CHG, 又包括非对称性的 CHH(H 代表 A, T, C 中的任意一个)^[14~16]. 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 3 种不同类型的胞嘧啶甲基化的建立都需要由域重排甲基转移酶 2(domains rearranged methyltransferase, DRM2)催化并依赖 RNA 介导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)途径来完成^[17]. 甲基化一旦建立, CG 和 CHG 位点甲基化的维持就需要不同的甲基转移酶来进行. 其中, CG 甲基化是由甲基转移酶 1(methyltransferase 1, MET1)及其辅助因子即甲基化调节因子(variant in methylation, VIM)维持^[18,19]; CHG 甲基化的维持则由植物特异的染色质甲基转移酶(chromomethylase 3, CMT3)催化, 通过 CMT3 和组蛋白 H3K9me2 修饰的核小体特异性互作, 采用一种自反馈增强循环的方式进行^[20]; 而 CHH 位点的甲基化在复制过程中不能被维持^[21,22].

1.2 RdDM

RdDM 最早是在类病毒感染的烟草中发现的^[23], 是目前发现的植物 DNA 甲基化建立的最主要方式, 主要包括 PolIV-RdDM 和 PolII-RdDM 两条途径. 经典的 PolIV-RdDM 的主要步骤包括: 基因组上的转座子和重复序列在依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 IV(DNA-dependent polymerase IV, PolIV)的作用下转录

为单链的 RNA 转录本, 然后在 RNA 依赖的 DNA 聚合酶 2(RNA-dependent RNA polymerase 2, RDR2)的作用下生成双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA); dsRNA 被 DCL3 蛋白切割为 24 nt 的 siRNA; 随后 siRNA 与 AGO4 结合成 AGO4-siRNA 复合物后, 与 PolV 结合在 DRM2 的作用下对与 siRNA 同源的基因组序列进行甲基化修饰, 称为 PolIV-RdDM^[24,25]. 甲基化除了受 24 nt 的 siRNA 调控外, 之前认为主要参与 PTGS 调控的 RDR6 产生的 21~22 nt 的 siRNA 也参与转座子元件的 DNA 甲基化修饰^[26]. 该通路主要过程包括: PolII 产生的转录物在 RDR6 的作用下生成双链, 然后经过 DCL2 和 DCL4 加工成 21~22 nt siRNAs. 与 PolIV-RdDM 下游途径类似, 21~22 nt siRNAs 被 AGO4 或 AGO6 包装, 然后被 PolV 转录产物的绞手架 RNA 募集到沉默位点沉默转座子元件^[24,25]. 近年来的研究发现, 植物中 RdDM 除了能沉默 TE 原件和重复序列从而维持染色质的结构和基因组的稳定外, 还能抵御病毒、细菌等病原物侵染, 参与调控基因组印迹、副突变、表观等位基因的建立等过程^[25].

1.3 DNA 去甲基化

除了 RdDM 外, 植物中存在的 DNA 去甲基化可与 RdDM 共同维持植物的甲基化水平, 包括 DNA 复制相关的被动去甲基化和 DNA 糖基化酶参与的主动去甲基化^[27~29]. 被动去甲基化是指在新合成的 DNA 上利用未甲基化的胞嘧啶替代甲基化的胞嘧啶, 其发生不需要糖基化酶的参与^[21]. 主动去甲基化需要依赖 DNA 糖基化酶对甲基化的胞嘧啶进行切除修复, 拟南芥中主要涉及 4 种 DNA 糖基化酶, 包括沉默抑制因子(repressor of silencing, ROS1)、转葡萄糖基酶(demeter, DME)、类转葡萄糖基酶蛋白 2(DME-like 2, DML2)和 DML3. 其中, ROS1 能够抑制转基因的 TGS; DME 与胚乳发育的全基因组去甲基化和基因印迹的建立相关; DML2 和 DML3 可与 ROS1 共同作用于基因组多个位点的去甲基化. 研究发现, ROS1 与 RdDM 相关, 其表达受甲基化水平的调节. 拟南芥中 RdDM 途径中的 MET1 突变后, ROS1 的表达水平显著下降, 表明拟南芥中 DNA 去甲基化与 RdDM 存在既合作又竞争的关系^[30,31].

2 DNA 甲基化在植物防御双生病毒侵染中的作用

2.1 双生病毒可诱导并成为 DNA 甲基化介导的 TGS 的靶标

双生病毒一旦侵入植物细胞后,其单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)基因组在寄主 DNA 聚合酶等组分的作用下,在细胞核内启动病毒互补链的复制,形成双链共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA); cccDNA 与组蛋白结合形成微染色体,在寄主 DNA 聚合酶 II 的作用下转录生成复制相关蛋白(Rep),以滚环复制或重组依赖型复制的方式启动病毒链的复制,产生大量异构线性化的双链 DNA(heterogeneous linear dsDNA, hdsDNA)^[32]。近年来,随着表观遗传学研究的深入,人们认识到除了 PTGS 外, DNA 甲基化介导的 TGS 在植物抗双生病毒侵染中也具有重要作用。

双生病毒根据基因组结构、介体种类以及寄主范围的不同被划分为 7 个属,包括玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)、菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)、番茄伪曲顶病毒属(*Topocuvirus*)、甜菜曲顶病毒属(*Curtovirus*)、伊朗甜菜曲顶病毒属(*Becurtovirus*)、画眉草条纹病毒属(*Eragrovirus*)和芜菁曲顶病毒属(*Turncurtovirus*)^[33,34]。尽管不同属病毒之间的序列相似性较低,但不同的双生病毒侵染寄主后可以诱导 DNA 甲基化介导的 TGS 并成为其靶标^[1,3,6,7]。利用亚硫酸氢盐测序等方法,研究者们发现 *Curtovirus* 属的甜菜曲顶病毒(beet curly top virus, BCTV)、甜菜严重曲顶病毒(beet severe curly top virus, BSCTV)以及 *Begomovirus* 属的甘蓝曲叶病毒(cabbage leaf curl virus, CaLCuV)和中国番茄黄曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)等多种双生病毒侵染植物后病毒的基因组 DNA 发生了不同程度的甲基化,甲基化既可以发生在对称性的 CG 位点,也可以发生在非对称性的 CHG 和 CHH 位点,暗示着 DNA 甲基化是植物作用于双生病毒科病毒的一种普遍的表观遗传修饰^[35-37]。对撒丁岛番茄黄曲叶病毒(tomato yellow leaf curl Sardina virus, TYLCSV)和苘麻花叶病毒(abutilon mosaic virus, AbMV)不同构型 DNA 的甲基化情况进行分析,发现双生病毒复制过

程中甲基化偏向作用于 hdsDNA,而 ssDNA 和环状双链 DNA 的甲基化发生比例低,暗示着双生病毒复制过程中能够逃避植物的 DNA 甲基化修饰^[38]。此外,番茄曲叶病毒(tomato leaf curl virus, ToLCV)的启动子驱动 GUS 表达的转基因植物接种 ToLCV 后会引发 GUS 的转基因沉默,所引发的沉默与 ToLCV 启动子的高度甲基化有关,而且在接种其他异源双生病毒时不会引起该现象,表明病毒侵染过程中能够产生序列特异并且介导 TGS 的信号^[39,40]。

2.2 植物 DNA 甲基化介导的抗双生病毒作用

现有的一些实验证据表明, DNA 甲基化介导的 TGS 是植物抵御双生病毒侵染的重要机制(图 1)。通过在烟草原生质体中导入胞嘧啶甲基化的番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV) DNA, Brough 等人^[41]发现, TGMV 在烟草原生质体中的复制水平降低到原来的 1/20~1/5,表明体外甲基化双生病毒的基因组能够抑制双生病毒的复制。利用遗传学等手段发现甲基化缺陷的拟南芥突变体,如 *npr2a*, *ago4* 和 *ddm1*,能够增强对 CaLCuV 和 BCTV 的敏感性,而且相关突变体中病毒基因组的甲基化水平显著降低,为证明 DNA 甲基化介导的抗双生病毒作用提供了有力的证据^[35]。

DNA 甲基化还被证实与双生病毒侵染引起的症状恢复现象相关。非洲木薯花叶病毒(African cassava mosaic virus, ACMV)等木薯双生病毒侵染木薯后,不仅产生 21 和 22 nt 的 siRNA,还产生 24 nt 的 siRNA,而且恢复组织中病毒来源的 siRNA 的总量较发病组织中高^[42]。此外, BCTV L2-突变体侵染引起的症状恢复与 DNA 甲基化相关,且依赖于 AGO4^[35]。由于 AGO4-siRNA 复合体是 RdDM 途径中的重要组分,暗示着病毒来源的 24 nt 的 siRNA 可能介导 TGS 从而引起症状恢复。然而,在辣椒金色花叶病毒(pepper golden mosaic virus)侵染后的症状恢复现象中,病毒 DNA 的甲基化水平与病毒来源的 siRNA 的总量呈负相关关系,即恢复组织中病毒来源的 siRNA 的总量较发病组织低,而病毒 DNA 的甲基化水平却显著高于发病组织中病毒基因组的甲基化水平^[43]。因此,将来需进一步明确双生病毒 DNA 甲基化发生的机制。

DNA 甲基化还能够介导植物对双生病毒的抗性。在印度绿豆黄花叶病毒(mungbean yellow mosaic

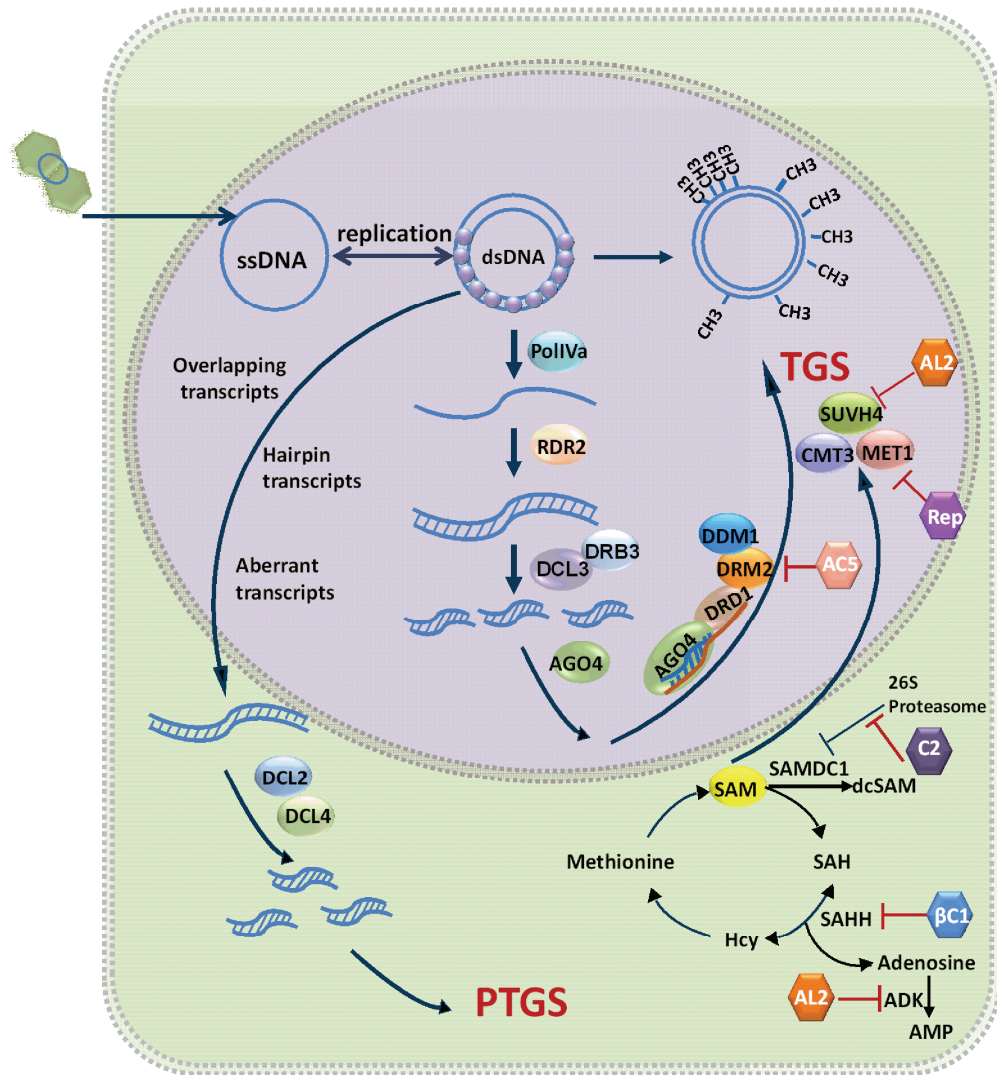


图1 植物 DNA 甲基化介导的 TGS 抗双生病毒作用模式图

Indian virus, MYMIV)侵染的抗病大豆(*Glycine max*)以及新德里番茄曲叶病毒(tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV)侵染的抗病番茄中,病毒基因间隔区的甲基化水平明显高于其所侵染的感病品种中病毒 DNA 的甲基化水平^[44,45]。值得关注的是,与典型的 NBS-LRR 类植物抗性基因不同的是,目前已发现的番茄黄曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)抗性基因 *Ty-1/Ty-3* 编码了依赖 RNA 的聚合酶 RDR γ , 能够通过 DNA 甲基化介导番茄对 TYLCV 的抗性,且抗性能够被黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)克服^[46]。由于 CMV 编码的 2b 蛋白能够通过抑制 AGO4 来干扰 TGS, CMV 可能通过

2b 来克服 *Ty-1/Ty-3* 介导的对 TYLCV 的抗性,进一步说明了 DNA 甲基化在植物抗双生病毒中的作用。

3 双生病毒编码的蛋白抑制 DNA 甲基化

为了逃脱植物的防御反应,双生病毒在与植物长期斗争中进化出能够干扰 DNA 甲基化的抑制子,包括双生病毒编码的 AC2/AL2/L2/C2, Rep, AC5, C4 和 V2, 以及双生病毒伴随的卫星 betasatellite 编码的 β C1 蛋白。研究表明,尽管双生病毒编码的 TGS 抑制子之间序列相似性较低,但已鉴定的 TGS 抑制子主要通过不同策略抑制或降低 SAM 来干扰甲基循环从

而抑制甲基化, 或者通过下调 RdDM 途径中甲基转移酶的表达来干扰 DNA 甲基化修饰(图 1 和表 1)。

3.1 干扰甲基循环的双生病毒 TGS 抑制子

双组分双生病毒编码的 AC2(或 AL2)蛋白是一类转录激活蛋白, 由 N 端核定位信号, 中间锌指结构和 C 端转录激活区域组成。AL2 被证明能够激活双生病毒晚期基因的表达, 而 *Curtovirus* 属编码的 C2(或 L2)虽然在病毒基因组中的位置与 AC2 相似, 除了锌指结构外, 与 AC2 没有序列同源性, 不能激活晚期基因的表达。尽管 AL2 和 L2 在序列上存在较大差异, AL2 和 L2 均能抑制 PTGS, 且能与腺苷激酶 (adenosine kinase, ADK) 互作并且抑制 ADK 的活性^[47,48]。研究发现, TGMV 编码的 AL2 和 BCTV 编码的 L2 还能够回复已建立的 GFP 转基因的 TGS, 下调拟南芥全基因组 CHG, CHH 位点的甲基化水平, 激活拟南芥中已知因甲基化而发生 TGS 的位点, 如 *F-box*, *AtSN1*, *Athila* 的表达^[49]。由于 ADK 是甲基循环中 SAM 产生所必需的, 在拟南芥中干扰 ADK 的表达同样能够激活 *F-box*, *AtSN1*, *Athila* 的表达, 表明 AL2 和 L2 可能通过与 ADK 互作并且抑制 ADK 的活性干扰甲基循环。此外, 完整的 AL2 蛋白还能够激活 *CACTA-like* 的表达, 而表达不具有转录激活活性的 AL2 突变体以及 L2 均不能激活 *CACTA-like* 的表达, 推测 AL2 以转录依赖和转录不依赖的方式抑制 TGS, 而 L2 则可能通过转录不依赖的方式抑制 TGS^[49]。进一步研究发现, AL2 和 L2 回复已建立的 TGS 的能力与植物的发育状态密切相关。当植物处于营养生长

阶段, AL2 和 L2 均能回复已建立的 GFP 转基因的 TGS; 然而, 当植物处于生殖生长阶段, 只有 AL2 才能够回复已建立的 GFP 的 TGS, 且这种回复 TGS 的能力与其转录激活活性无关, 暗示着 AL2 还可能通过其他方式抑制 TGS^[55]。近期研究发现, AL2 能够与组蛋白甲基转移酶 SUVH4(kryptonite, KYP)互作并且抑制 KYP 转移甲基的活性, 降低了病毒微染色体的 TGS, 从而逃脱植物防御反应^[50]。

与 BCTV 编码的 L2 不同的是, *Curtovirus* 的 BSCTV 编码的 C2 蛋白则通过与拟南芥中的 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶 (S-adenosyl methionine decarboxylase, SAMDC1) 互作并且抑制 26S 蛋白酶体对 SAMDC1 的降解来影响 DNA 甲基化^[36]。SAMDC1 是多胺合成过程中的一个关键酶, 能够将甲基循环中的供体 SAM 转变成脱羧的 dcSAM。dcSAM 可与 SAM 竞争作为甲基转移酶的底物, 其含量的升高将抑制 DNA 甲基化。生化分析发现, SAMDC1 蛋白的降解可以被 26S 蛋白酶体抑制剂 MG132 所阻止, 表明 SAMDC1 通过 26S 蛋白酶体降解。BSCTV C2 与 SAMDC1 互作则能够抑制 SAMDC1 降解, 使得 SAMDC1 的蛋白含量增加, 提高了 SAM 转变成 dcSAM 的效率, 从而使甲基循环底物减少, 抑制了 DNA 甲基化。通过分析过表达 C2 的转基因拟南芥, 发现 C2 能够抑制 DNA 的从头甲基化, 降低 CG, CHG 和 CHH 3 种不同位点的甲基化水平。C2 突变导致 BSCTV 的侵染率和病毒 DNA 的积累量降低, 病毒 DNA 的甲基化水平显著提高, 与 *samdc1* 突变体对 BSCTV 侵染的影响相似, 而转基因过表达 SAMDC1

表 1 已鉴定的双生病毒 TGS 抑制子及其作用机制

病毒名称	TGS 抑制子	TGS 抑制子的 靶标蛋白	作用机制	参考文献
甜菜曲顶病毒属				
甜菜曲顶病毒	C2	ADK	与 ADK 互作并且抑制 ADK 的活性	[47~49]
甜菜严重曲顶病毒	C2	SAMDC1	与 SAMDC1 互作抑制 26S 蛋白酶体对 SAMDC1 的降解	[36]
菜豆金色花叶病毒属				
甘蓝曲叶病毒	AC2	ADK	与 ADK 互作并且抑制 ADK 的活性	[47~49]
番茄金色花叶病毒	AC2	ADK	与 ADK 互作并且抑制 ADK 的活性	[47,48]
甘蓝曲叶病毒	AC2	SUVH4/KYP	与 SUVH4/KYP 互作并且抑制 KYP 转移甲基的活性	[50]
中国番茄黄曲叶病毒卫星	βC1	SAHH	与 SAHH 互作抑制 SAHH 的活性	[37]
撒丁岛番茄曲叶病毒	Rep	MET1	下调 MET1 的表达	[51]
		CMT3	下调 CMT3 的表达	[51]
印度绿豆黄花叶病毒	AC5	DRM2	抑制 DRM2 的表达	[52]
云南番茄曲叶病毒	C4	?	?	[53]
番茄黄曲叶病毒	V2	?	?	[54]

可恢复 C2 突变引起的病毒积累量下降, 且能够抑制 DNA 甲基化. 这些结果表明, C2 通过正调控 SAMDC1 影响寄主对自身基因及病毒基因组的从头甲基化过程^[36]. 进一步的研究发现, C2 能够抑制拟南芥中水杨酸(salicylic acid, SA)途径上游的调控基因 *ACD6* 启动子的胞嘧啶甲基化, 降低 *ACD6* 启动子来源的 siRNA 的积累, 增强 SA 途径以及谷胱甘肽 S-转移酶 14(glutathione S-transferase 14, GSTF14)合成途径相关基因的表达, 表明 C2 能够抑制 siRNA 介导的 DNA 甲基化^[56].

Begomovirus 属的单组分双生病毒经常伴随一类卫星 betasatellite, 所组成的病害复合体对多个国家和地区的作物生产造成了毁灭性危害^[57,58]. 自 2000 年首次报道以来^[59], 围绕 betasatellite 的功能开展了系统的研究并取得了重要进展^[1]. Betasatellite 仅在互补链上编码一个大小和位置比较保守的 β C1 蛋白. 研究发现, β C1 是症状决定因子, 不仅能够抑制 PTGS, 而且具有抑制 DNA 甲基化介导的 TGS 等功能^[1]. 通过对病毒基因组以及寄主基因组 DNA 的甲基化情况进行测定, 发现 TYLCCNV 伴随的卫星(TYLCCNB)编码的 β C1 蛋白可降低 TYLCCNV 和寄主 DNA 的甲基化水平. 更重要的是, β C1 能够互补甲基化抑制功能缺失的 BCTV L2-突变体, 有效抑制 DNA 甲基化, 阻止 BCTV L2-侵染引起的次级侵染组织恢复. 进一步的研究表明, β C1 与甲基循环中的关键酶 S-腺苷-高半胱氨酸水解酶(SAHH)互作并且抑制 SAHH 的活性. 在甲基循环中, SAHH 能够将转甲基反应的竞争性抑制剂 S-腺苷-高半胱氨酸(SAH)转化为高半胱氨酸和腺苷, 腺苷可重新再次合成 SAM, 而 SAHH 活性的抑制则导致 SAH 的积累, 抑制了甲基转移反应. 由于核定位信号缺失的 β C1 突变体不能与 SAHH 互作, 也丧失了抑制 TGS 的能力, 推测 β C1 通过与 SAHH 互作并且抑制 SAHH 的活性来阻止 SAM 的再生合成, 从而抑制了寄主的 DNA 甲基化^[37].

3.2 作用于 DNA 甲基转移酶的双生病毒 TGS 抑制子

双组分双生病毒编码的 AC1 和单组分双生病毒编码的 C1, 又称复制相关蛋白(Rep), 是一个在序列、位置与功能上都非常保守的多功能蛋白, 不仅能够起始双生病毒的滚环复制, 而且能够抑制 CG 位点的

DNA 甲基化^[51,60]. 与动物 DNA 病毒调控 DNA 甲基化的作用机制相似, 单组分双生病毒 TYLCSV 和 TYLCV 以及双组分双生病毒 ACMV 和 TGMV 侵染能够下调本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中 *NbMET1*, *NbCMT3* 和 *NbROS1* mRNA 的表达量. 通过表达 Rep, C2, C4 和 V2 以及构建分别突变 Rep, C2, C4 和 V2 的 TYLCSV 侵染性克隆, 发现 TYLCSV 依赖 Rep 来降低 *MET1* 和 *CMT3* mRNA 的表达量. 但是与动物 DNA 病毒不同的是, Rep 下调 *MET1* 和 *CMT3* mRNA 的表达并不依赖 Rep 与 NbRBR1 的互作. 进一步将 TYLCSV 的 Rep 转化拟南芥, 发现拟南芥中 Rep 的过表达同样能够抑制 *AtMET1*, *AtCMT3* 和 *AtROS1* 基因的表达, 而且能够抑制拟南芥中 *AtFWA* 和 *AtCACTA-like* 的 CG 位点甲基化, 激活 *AtFWA* 和 *AtCACTA-like* 的表达. 由于 Rep 主要降低 CG 位点的甲基化, 推测 Rep 通过下调 *MET1* 的表达降低 CG 位点的甲基化^[51]. 然而, Rep 的表达同样能够抑制 *CMT3* 和 *ROS1* 的表达, Rep 如何通过同时调控甲基转移酶和去甲基化酶来降低 CG 甲基化还有待进一步研究.

少数双组分双生病毒的 DNA-A 组分以及单组分双生病毒 CP 的部分互补链上编码了一个 AC5 蛋白. Li 等人^[52]对 MYMIV 编码的 AC5 蛋白的功能开展研究发现, 尽管 AC5 对于 MYMIV 致病不是必需的, 但是 AC5 能够回复 GFP 转基因的转录水平基因沉默, 并且显著抑制 CHG 和 CHH 水平的甲基化. 与野生型植株相比, 转基因过表达 AC5 的本氏烟表现出迟花与矮化的表型. 利用 qRT-PCR 检测 RdDM 途径中关键蛋白的 mRNA 水平, 发现 AC5 能够显著抑制 *DRM2* 基因的表达, 增强去甲基化酶 *ROS1* 和 *ROS2* 的表达. 由于 *DRM2* 在甲基化途径中与 *DRM1* 共同指导 DNA 的从头甲基化, 推测 AC5 通过下调 *DRM2* 的表达抑制 CHH 类型的甲基化^[52].

3.3 作用机制未知的双生病毒 TGS 抑制子

除了上述已鉴定的 TGS 抑制子外, 云南番茄曲叶病毒(tomato leaf curl Yunnan virus, TLCYnV)编码的 C4 蛋白以及 TYLCV 编码的 V2 蛋白也被证实能够回复 GFP 转基因的 TGS, 但其作用的机制尚需深入研究^[53,54].

4 结语

本文从植物与双生病毒相互竞赛的角度综述了

DNA 甲基化在植物与双生病毒互作中的作用. 由于双生病毒复制过程中形成的 dsDNA 复制中间体可与组蛋白结合形成病毒微染色体, 双生病毒也像植物染色体一样受到 DNA 甲基化等表观遗传调控, 同时双生病毒似乎可以巧妙地通过不同策略干扰甲基循环或者作用于 RdDM 通路中的甲基转移酶来逃脱 DNA 甲基化介导的植物防御反应. 近期研究发现, CaLCuV 的 AL2 蛋白还可与组蛋白甲基转移酶 KYP 互作来调控与病毒微染色体结合的组蛋白甲基化修饰, 从而抑制 CHH 位点的甲基化^[50], 暗示双生病毒编码的蛋白可能通过多种机制来抑制 DNA 甲基化. 随着研究的深入, 人们发现 DNA 甲基化的发生与维

持还受到组蛋白修饰的影响和控制. 因此, 今后仍需进一步明确组蛋白修饰等表观遗传调控在植物与双生病毒互作中的作用和机制. 此外, 已鉴定的多个双生病毒 TGS 抑制子, 如 V2, β C1, 都是多功能蛋白, 不仅与症状形成有关, 而且还能够抑制 PTGS^[61-66]. 那么 V2 和 β C1 等蛋白如何能够同时抑制 PTGS 和 TGS 呢? 不同功能之间的关联网络尚需进一步研究. 由于双生病毒具有与其他病毒不同的侵染和复制方式, 以双生病毒为模式研究 DNA 甲基化建立和维持的机制以及 DNA 甲基化在植物与双生病毒复制和侵染中的作用不仅可以加深对双生病毒致病分子基础的理解, 也有助于研究植物的表观遗传途径, 具有重要的科学意义.

参考文献

- 1 Zhou X. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu Rev Phytopathol*, 2013, 51: 357-381
- 2 Nawaz-ul-Rehman M S, Fauquet C M. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett*, 2009, 583: 1825-1832
- 3 Hanley-Bowdoin L, Bejarano E R, Robertson D, et al. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 777-788
- 4 Rojas M R, Hagen C, Lucas W J, et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 361-394
- 5 Sahu P P, Sharma N, Puranik S, et al. Involvement of host regulatory pathways during geminivirus infection: a novel platform for generating durable resistance. *Funct Integr Genomics*, 2014, 1: 47-58
- 6 Pumplin N, Voinnet O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 745-760
- 7 Raja P, Wolf J N, Bisaro D M. RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799: 337-351
- 8 Ding S W. RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 632-644
- 9 Llave C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 701-707
- 10 Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 265-272
- 11 Csorba T, Kontra L, Burgyan J. Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 2015, 479-480: 85-103
- 12 Guo W, Liew J Y, Yuan Y A. Structural insights into the arms race between host and virus along RNA silencing pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2014, 89: 337-355
- 13 Pooggin M M. How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 15233-15259
- 14 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gene Dev*, 2002, 16: 6-21
- 15 Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 2008, 452: 215-219
- 16 Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 2007, 39: 61-69
- 17 Naumann U, Daxinger L, Kanno T, et al. Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2011, 187: 977-979
- 18 Kankel M W, Ramsey D E, Stokes T L, et al. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 2003, 163: 1109-1122
- 19 Woo H R, Dittmer T A, Richards E J. Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000156

- 20 Lindroth A M, Cao X, Jackson J P, et al. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 2001, 292: 2077–2080
- 21 Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204–220
- 22 Henderson I R, Jacobsen S E. Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 2007, 447: 418–424
- 23 Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, et al. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 1994, 76: 567–576
- 24 Matzke M A, Kanno T, Matzke A J. RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66: 243–267
- 25 Matzke M A, Mosher R A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 394–408
- 26 Nuthikattu S, McCue A D, Panda K, et al. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21–22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol*, 2013, 162: 116–131
- 27 Furner I J, Matzke M. Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 137–141
- 28 Zhu J K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 143–166
- 29 Penterman J, Zilberman D, Huh J H, et al. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 6752–6757
- 30 Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, et al. Transgenerational stability of the *Arabidopsis* epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, 2007, 130: 851–862
- 31 Penterman J, Uzawa R, Fischer R L. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1549–1557
- 32 Jeske H. Geminiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 331: 185–226
- 33 Brown J K, Fauquet C, Briddon R, et al. *Geminiviridae*. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier, 2012
- 34 Varsani A, Navas-Castillo J, Moriones E, et al. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Arch Virol*, 2014, 159: 2193–2203
- 35 Raja P, Sanville B C, Buchmann R C, et al. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol*, 2008, 82: 8997–9007
- 36 Zhang Z, Chen H, Huang X, et al. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 273–288
- 37 Yang X, Xie Y, Raja P, et al. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002329
- 38 Paprotka T, Deuschle K, Metzler V, et al. Conformation-selective methylation of geminivirus DNA. *J Virol*, 2011, 85: 12001–12012
- 39 Bian X Y, Rasheed M S, Seemanpillai M J, et al. Analysis of silencing escape of tomato leaf curl virus: an evaluation of the role of DNA methylation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 614–624
- 40 Seemanpillai M, Dry I, Randles J, et al. Transcriptional silencing of geminiviral promoter-driven transgenes following homologous virus infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 429–438
- 41 Brough C L, Gardiner W E, Inamdar N M, et al. DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 703–712
- 42 Chellappan P, Vanitharani R, Pita J, et al. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J Virol*, 2004, 78: 7465–7477
- 43 Rodriguez-Negrete E A, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante R F. RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J Virol*, 2009, 83: 1332–1340
- 44 Yadav R K, Chattopadhyay D. Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a geminivirus. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24: 1189–1197
- 45 Sahu P P, Sharma N, Puranik S, et al. Post-transcriptional and epigenetic arms of RNA silencing: a defense machinery of naturally tolerant tomato plant against tomato leaf curl New Delhi virus. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 1015–1029
- 46 Butterbach P, Verlaan M G, Dulleman A, et al. Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12942–12947
- 47 Wang H, Buckley K J, Yang X, et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2

- proteins. *J Virol*, 2005, 79: 7410–7418
- 48 Wang H, Hao L, Shung C Y, et al. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, 2003, 15: 3020–3032
- 49 Buchmann R C, Asad S, Wolf J N, et al. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol*, 2009, 83: 5005–5013
- 50 Castillo-Gonzalez C, Liu X, Huang C, et al. Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *eLife*, 2015, 4: e06671
- 51 Rodriguez-Negrete E, Lozano-Duran R, Piedra-Aguilera A, et al. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol*, 2013, 199: 464–475
- 52 Li F, Xu X, Huang C, et al. The AC5 protein encoded by mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. *New Phytol*, 2015, 208: 555–569
- 53 Xie Y, Zhao L, Jiao X, et al. A recombinant begomovirus resulting from exchange of the C4 gene. *J Gen Virol*, 2013, 94: 1896–1907
- 54 Wang B, Li F, Huang C, et al. V2 of tomato yellow leaf curl virus can suppress methylation-mediated transcriptional gene silencing in plants. *J Gen Virol*, 2014, 95: 225–230
- 55 Jackel J N, Buchmann R C, Singhal U, et al. Analysis of geminivirus AL2 and L2 proteins reveals a novel AL2 silencing suppressor activity. *J Virol*, 2015, 89: 3176–3187
- 56 Yang L P, Fang Y Y, An C P, et al. C2-mediated decrease in DNA methylation, accumulation of siRNAs, and increase in expression for genes involved in defense pathways in plants infected with beet severe curly top virus. *Plant J*, 2013, 73: 910–917
- 57 Mansoor S, Zafar Y, Briddon R W. Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. *Trends Plant Sci*, 2006, 11: 209–212
- 58 Mansoor S, Briddon R W, Zafar Y, et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 128–134
- 59 Saunders K, Bedford I D, Briddon R W, et al. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6890–6895
- 60 Fondong V N. Geminivirus protein structure and function. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14: 635–649
- 61 Cui X F, Li G X, Wang D W, et al. A begomovirus DNA β -encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J Virol*, 2005, 79: 10764–10775
- 62 Cui X F, Tao X R, Xie Y, et al. A DNA β associated with tomato yellow leaf curl China virus is required for symptom induction. *J Virol*, 2004, 78: 13966–13974
- 63 Li F, Huang C, Li Z, et al. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1003921
- 64 Bar-Ziv A, Levy Y, Citovsky V, et al. The tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) V2 protein inhibits enzymatic activity of the host papain-like cysteine protease CYP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460: 525–529
- 65 Glick E, Zrachya A, Levy Y, et al. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 157–161
- 66 Mubin M, Amin I, Amrao L, et al. The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus is countered by the C2 protein. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 245–254

Molecular Mechanisms of DNA Methylation in Plant-Geminivirus Interaction

YANG XiuLing, DING Bo, YANG QiuYing & ZHOU XuePing

*State Key Laboratory For Plant Diseases and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Beijing 100193, China*

DNA methylation is a fundamental epigenetic mark that has been implicated in maintaining genome stability, regulating gene expression, controlling transposon silencing and defending against pathogen invasion. It also serves as a potent defense against single-stranded DNA containing geminiviruses. During this process, geminiviral minichromosomes are subject to DNA methylation, leading to transcriptional gene silencing. As a counterdefense, geminiviruses have developed diverse strategies to interfere with the methyl cycles or target methyltransferase component of the RNA-directed DNA methylation pathway of their host plants through evolution. This review describes our current knowledge of the antiviral role of DNA methylation in geminivirus infection. Research advances on the epigenetic arms race between plant and geminivirus will help understand the molecular basis of plant-geminivirus interaction.

DNA methylation, geminivirus, plant-virus interaction

doi: 10.1360/N052016-00038